第 21 回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

HIV-1 増殖抑制に寄与する HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の研究

Study on HIV-1-Specific CD8$^+$ T Cells with Capacity to Control of HIV-1 Replication

久 世 望
Nozomi KUSE
熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター
Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Kumamoto University

日本エイズ学会誌 **23** : 65-70，2021

はじめに

HIV-1 の感染予防および病態制御において，CD8 陽性の HIV 特異的細胞傷害性 T 細胞（CD8$^+$ Cytotoxic T Lymphocyte ; CTL）が重要な役割を果たしている。CTL の応答は抗原を結合した HLA 分子を介するが，この HLA 遺伝子型がエイズの病態進行と深く関係していることが知られている。筆者はエイズの病態進行とそれに関連する CTL の免疫応答を解析することによって，発症遅延に関与している HLA とその長期的 HIV-1 増殖抑制機構を明らかにしてきた。またここ最近では T 細胞を用いたエイズワクチンや根治療法を目指した基礎研究を行ってきた。本編では筆者がこれまで本領域で得られた成果について紹介したい。

1. エイズ発症遅延に関与している HLA 遺伝子型

HIV-1 感染症の病態進行にさまざまな遺伝子的要因が関与していることが報告されているが，HLA 遺伝子型もその 1 つである[1]。HLA-B*57/58:01, HLA-B*27, HLA-B*13 はエイズ発症遅延と相関があり，これらの HLA 分子を介する CTL 応答が HIV-1 増殖抑制機構に関与していることがエイズ発症遅延者または長期未発症者の解析によって明らかにされてきた[2~5]。HLA-B*57 を持つ長期未発症者では，HLA-B*57 に拘束される GagTW10 エピトープ特異的 CTL の免疫圧によってウイルス増殖能の低下を引き起こす T242N 変異がエピトープ領域に出現し，体内の HIV-1 の増殖を抑制できることが分かっていた[6]。また HLA-B*27 においては，HIV-1 感染者で高頻度に検出され，強いエフェクター機能を保持している GagKK10 エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞が HIV-1 抑制機構に関与していることが明らかになっていた[5]。一方で，これらの HLA 遺伝子は日本人には非常に稀であり，エイズ発症遅延との相関が報告されていた HLA-B*51 は日本人に比較的高頻度にみられたが，その発症遅延のメカニズムは不明であった。

そこで筆者らは，1985 年以前に HIV-1 に感染し 1997 年まで無治療の日本人血友病患者 108 名をコホートとして，HLA-B*51:01 とエイズ発症遅延との相関について解析を行った[7]。このようなコホートを解析することによって，HIV-1 に変異がまだ蓄積されていない野生型ウイルスに対する CTL 応答を調べることでき，また長期的解析が可能となった。1998 年の時点でまだ無治療で CD4 が 350 cells/μL より多い発症遅延者 18 名を very slow progressors（VSPs），それ以外の 90 名を発症遅延者（slow-progressors ; SPs）として定義した。その結果，HLA-B*51:01 陽性者の頻度は SP のグループが 16.7% に対して，VSP のグループでは 50% もみられ SP のグループよりも有意に高いことが分かった。さらに 1998 年から 2007 年までの VSP のグループの病態進行を解析した結果，HLA-B*51 陽性者は HLA-B*51 陰性者に比べて病態の進行に遅延がみられた（図 1）。これらの解析から HIV-1 に感染した日本人血友病患者において，HLA-B*51:01 アリルは病態進行遅延との関与があり，プロテクトアリルとして約 20 年以上も機能していたことが明らかにできた。

2. HIV-1 の増殖を抑制できる HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞

以前，筆者が所属する研究室では HLA-B*51:01 拘束性エピトープ特異的 CTL の中でも Pol TI8（TAFTIPSI, RT128-135）と Pol LI9（LPPVVAKEI, Int28-36）エピトープ特異的 CTL が HIV-1 に対する強いウイルス増殖抑制能を持っていることを *in vitro* 評価系にて示していた[8]。このことからこれらの 2 つの HLA-B*51:01 拘束性 CTL が HLA-B*51:01 陽

著者連絡先：久世 望（〒860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1 熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター）
2021 年 3 月 17 日受付

性のエイズ発症遅延の機構に関与していることが考えられた。筆者らはこれらの CTL の生体内での HIV-1 増殖抑制の役割を明らかにするため，HLA-B*51:01 陽性の発症遅延者の末梢血単核球細胞（PBMCs）を HLA-peptide 複合体（テトラマー）で染色して，HLA-B*51:01 拘束性 CD8 陽性 T 細胞の頻度と血中ウイルス量との相関を解析した[7]。4つの HLA-B*51:01 拘束性エピトープのうち，Pol TI8 だけがウイルス量と逆相関を示した（図2）。この結果から，HLA-B*51:01 陽性の発症遅延者の生体内では，Pol TI8 特異的 CD8 陽性 T 細胞が HIV-1 の増殖抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

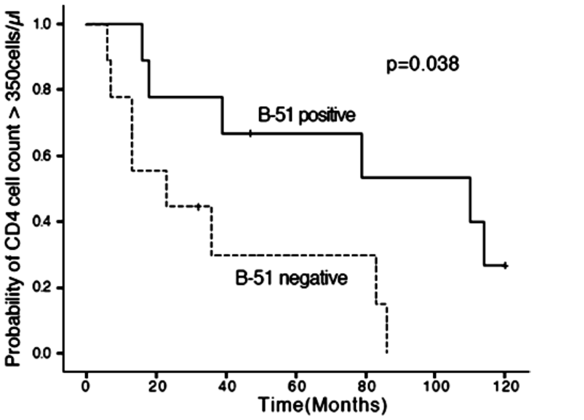

図 1　1998 年から 2007 年における HLA-B*51 とエイズ発症遅延の相関
文献 7 より。

CTL は HIV-1 の増殖を抑制できるが，その強い免疫圧によってエピトープ領域やその周辺に HIV-1 逃避変異が選択されることも知られていた[9,10]。Pol TI8 についても世界の 9 カ所のコホート解析によって HLA-B*51 陽性の HIV-1 感染者でこのエピトープの 8 番目（RT 135）の位置に逃避変異が蓄積していることが明らかにされていた[11]。解析を行ってきた HLA-B*51:01 陽性の HIV-1 感染血友病患者においても発症遅延者の多くが，野生型（Pol TI8-8I）ではなく CTL の認識能を大きく低下させる逃避変異体（TI8-8T, -8L または -8R）を持っていることが分かった[7]。このような HIV-1 逃避変異体が選択され，集団レベルに蓄積されることによって，TI8 特異的 CTL が HIV-1 の増殖を抑制できなくなってしまっていることが明らかにできた。実際にここ最近 HIV-1 に新たに感染した HIV-1 感染者において，HLA-B*51:01 は発症遅延と相関がみられず，プロテクティブ HLA として機能していないことが分かっている。

3.　長期 HIV-増殖抑制機構に関与している HIV-1 変異体

一方で，HLA-B*51:01 陽性の発症遅延者の中でも特に

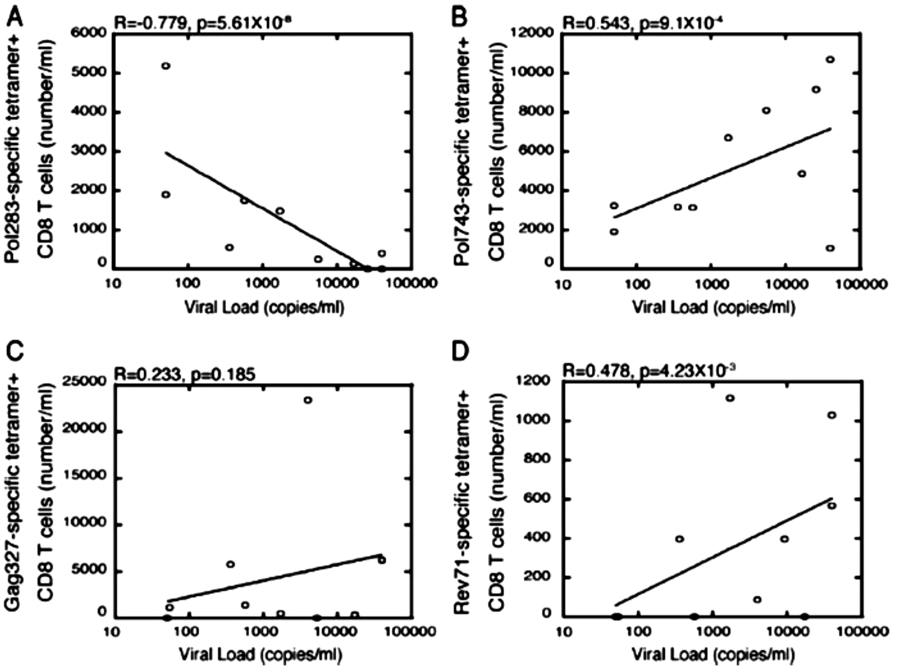

図 2　HLA-B51:01 拘束性 CD8 陽性 T 細胞の頻度と血中ウイルス量の相関
（A）Pol283（TI8）エピトープ，（B）Pol743（LI9）エピトープ，（C）Gag327（NI9）エピトープ，（D）Rev71（VL11）エピトープ。
文献 7 より改編。

無治療の状態で血中ウイルス量を非常に低く抑制できていた長期未発症者全員がCTLの認識能に大きな影響を与えないTI8-8V変異体を持っていることが分かった[7]。このことからHLA-B*51:01陽性HIV-1感染者の長期HIV-1増殖抑制機構にPol TI8特異的CD8陽性T細胞によるTI8-8V変異体の選択とその維持が関与していることが考えられた。HLA-B*51:01陽性の長期未発症者で8V変異体が選択される機構と変異選択後のHIV-1制御機構を明らかにするため，筆者は長期未発症で誘導されているPol TI8特異的CTLの8V変異に対する機能を解析した[12]。8V変異の出現前に誘導されていたCTLも出現後に誘導されたCTLどちらも野生型と8V変異体に対して強いHIV-1増殖抑制能を持っていたが，8V変異の出現前に誘導されていたCTLは野生型に比べて8V変異に対してわずかにウイルス増殖抑制能の低下を示した（図3）。つづいて8V変異と野生型ウイルスをCD4に共感染させCTLと共培養したのち，培養上清中のウイルスの頻度の変化を調べた。野生型と8V変異に対して機能の違いを示すCTLを加えると変異の頻度が増加しこの変異がCTLによって選択されてくることが分かった（図4）。一方で，変異体を野生型と同様に抑制できたCTLはこの変異体ウイルスを選択することができなかった（図4）。以上の結果より，8V変異は野生型に比べてわずかに抑制能の低下を示すTI8特異的CTLによって選択される逃避変異体であることが示唆された。さらに

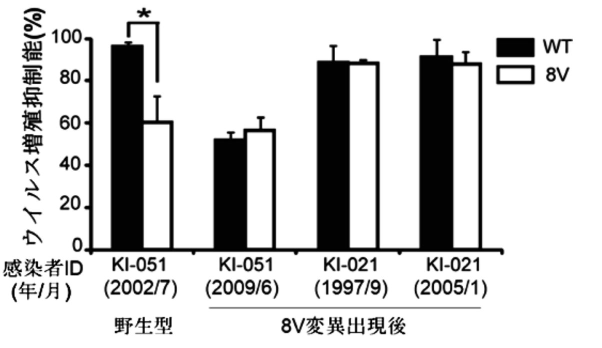

図 3 HLA-B*51:01拘束性Pol TI8特異的CTLのウイルス増殖抑制能

野生型ウイルスを持つ時期に誘導されているCTLと8V変異ウイルス出現後に誘導されたCTLの各ウイルスに対するHIV-1増殖抑制能を解析。

文献12を改編。

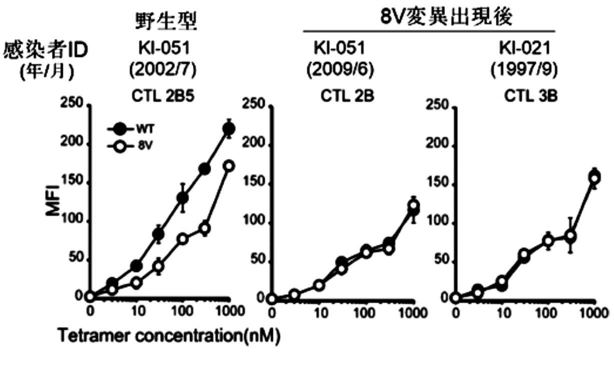

図 5 HLA-B*51:01拘束性Pol TI8特異的CTLの野生型および8Vテトラマーへの結合能。

文献12を改編。

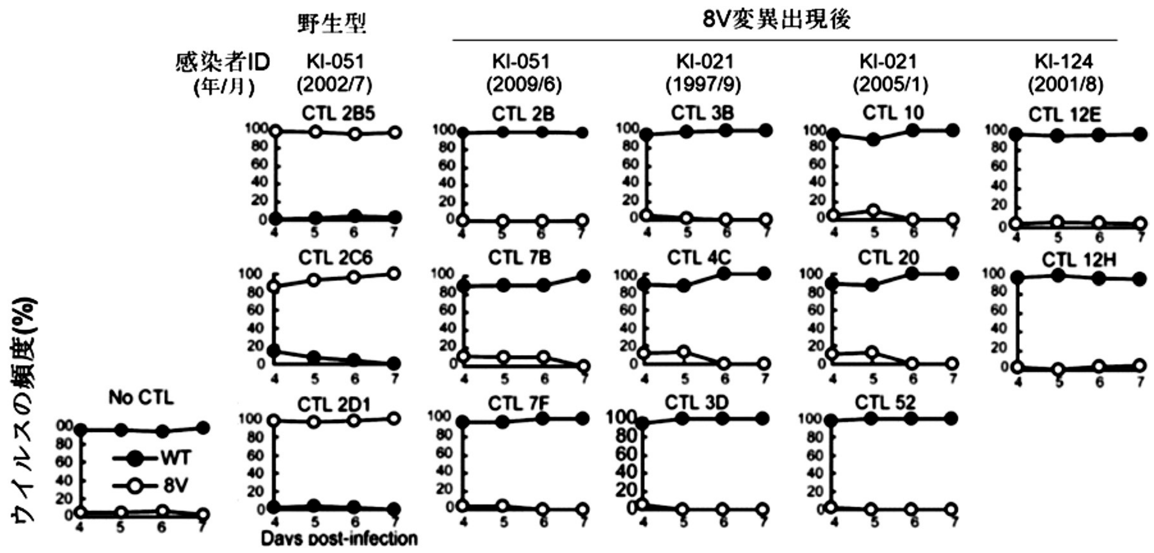

図 4 HLA-B*51:01拘束性Pol TI8特異的CTLによる8V変異の選択

野生型と8V変異ウイルスを共感染させたCD4とCTLを共培養を行い，培養上清中のウイルスの頻度を解析。

文献12を改編。

HLA-B51:01-TI8テトラマーを用いてCTLのTCRの結合能を測定したところ，8V変異を選択できるCTLは野生型に比べ8Vテトラマーへの結合能がわずかに弱く，一方で8Vを野生型同様に抑制できるCTLは2つのリガンドに対して同様の結合能を示すことができた（図5）。以上の結果より，HLA-B*51:01陽性の長期未発症者では，8V変異の選択に関わるCTLと8V変異選択後にこの変異ウイルスの増殖を強く抑制できる2つのタイプのcross reactive TI8特異的CTLがHIV-1の長期抑制機構に寄与していることが示唆された。

4. 長期HIV-1抑制機構に関与しているCTLの変異に対する認識機序

筆者はHLA-B*51:01陽性のHIV-1感染者で誘導されているTI8特異的CD8陽性T細胞のTCRの遺伝子解析を行い，8V変異を野生型と同様に認識できるTI8特異的CTLはpublic TCR clonotype（TRAV17/TRBV7-3 TCR）を発現していることを明らかにした[13]。HIV-1増殖抑制に関連しているpublic TCR（3B TCR）の認識機序を詳しく調べるために，Cardiff University（U.K）のAndrew K. Sewell教授の研究グループと共同研究を行った。筆者らは3B TCRおよびHLA-B51-TI8ペプチド複合体のタンパクを合成し，表面プラズモン共鳴法によってTCR-peptide-HLA複合体の相互作用を解析した[13]。一般的にウイルス特異的TCRのTCR-pHLA相互作用の解離定数は1～10 μMであることがしられていたが[14]，3B TCR-HLA-B51-TI8ペプチドの解離定数は81.8 μMと予想に反して高い数値が得られた（図6）。このことからpublic TCR clonotypeを持つTI8特異的CTLはTCRとHLA-B*51-TI8の結合能は非常に弱いにもかかわらずHIV-1を強く抑制できる機能を持っているという特徴が明らかになった。つづいて筆者らは3B TCRとHLA-B51-TI8ペプチドの結晶構造解析を行い，ヒトのTCRと8merペプチドの結晶構造において当時世界で初めての報告を行うことができた（図7）。この解析によりTI8ペプチドはHLA-B51に非常にフラットな状態で結合し，エピトープの4番目と7番目のアミノ酸がTCRとの相互作用に特に重要であることが分かった（図7）。HLA-B51と3B TCRの相互作用に比べるとTI8ペプチドと3B TCRの相互作用は非常に少なく，3B TCRがHLAに大きく依存して結合していることを明らかにすることできた（図7）。このためTI8エピトープの8番目に選択される8V変異は3B TCR-HLA-B51-TI8ペプチドの相互作用に大きな影響を及ぼさないという分子機構を解明できた。これらの結果はHIV-1を効果的に抑制できるHIV-1特異的CD8陽性T細胞の構造的特徴と認識機序を解明する上で重要な知見になると考えられた。

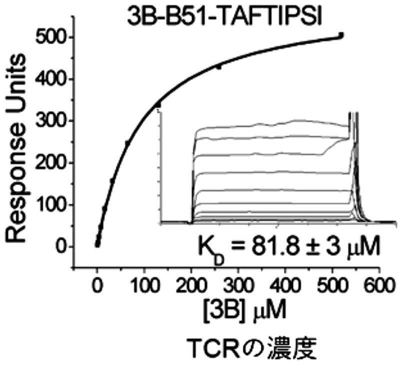

図6　3B TCRとHLA-B51-TI8の結合力を表面プラズモン共鳴法を用いて測定
文献13を改編。

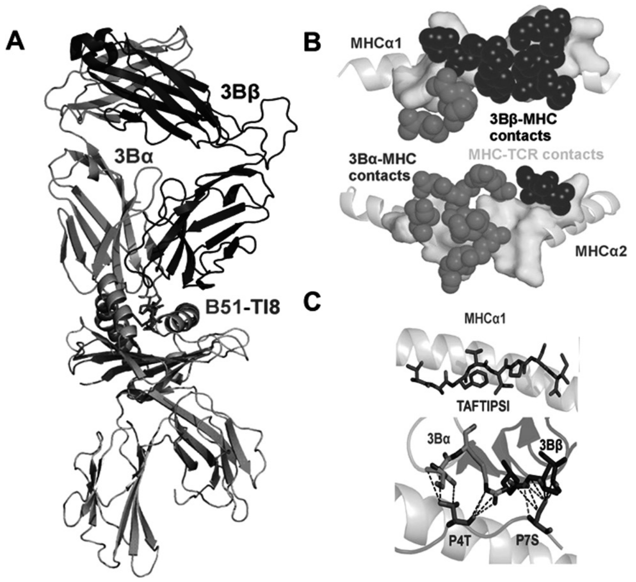

図7　HLA-B51-Pol TI8-TCRの相互作用
（A）結晶構造解析の全体像，（B）3B TCRとMHC（HLA-B51）との相互作用，（C）TI8ペプチドと3B TCRとの相互作用。
文献13を改編。

5. ナイーブT細胞から機能を有するHIV-1特異的CD8陽性T細胞の誘導

多剤併用療法（combination antiretroviral therapy : cART）の開始により，HIV-1感染者の血中ウイルス量を検出限界以下にまで抑制することが可能になったが，体内に潜伏感染しているウイルスまでは完全に排除できないことが分かっている[15,16]。そのためHIV-1潜伏感染細胞の減少・排除に向けた新たな治療法が求められる。潜伏感染再活性化剤（latency-reversing agent）などで再活性化させた潜伏感染細胞をCTLやNK細胞などの免疫応答などで排除する

Shock & Kill という方法が治療法の戦略の1つとして報告されている[17]。そこで筆者は潜伏感染細胞の排除に向けたCTLの誘導・応答について研究を行ってきた。長期間治療を受けているHIV-1感染者ではエフェクターT細胞の消失やメモリーT細胞の部分的な消失・機能低下も報告されており，感染細胞を排除できる機能を持ったCTLを効率よく誘導できないという課題がある。筆者はINSERM（フランス）のVictor Appay先生の研究グループと共同研究を行い，ナイーブT細胞から高機能を保有するHIV-1特異的CD8陽性T細胞を誘導できる方法の確立を試みた。さまざまなPattern recognition receptor（PRRs）ligandsの中でもSTING（Stimulator of IFN Genes）を活性化させるcyclic GMP-AM（cGAMP）がtype I IFNの産生を強く引き起こすことでHIV-1非感染者のナイーブT細胞からエフェクター機能の強いHIV-1特異的CD8陽性T細胞を誘導できることを示した[18,19]。筆者らはこれまでに体内でHIV-1を強く抑制することができ，流行しているHIV-1変異を広く認識できるプロテクティブCTLエピトープをいくつも同定してきた[20~23]。これらのエピトープを組み込んだ抗原あるいは抗原を発現するウイルスベクターワクチンとSTING活性化の技術を組み合わせることによって，治癒を目指した治療法またはエイズ予防法に貢献できる可能性も考えられる。

おわりに

本研究はHLA-B*51:01陽性の発症遅延者および長期未発症者のCTL応答とウイルスの動向を解析することで，どのようにしてCTLがHIV-1を長期的に抑制できているのか機能および構造生物学的なTCRの認識機序を解明しその機構を明らかにすることができた。生体内でHIV-1の抑制にどのようなCTL応答が効果的でまたどのようなTCR構造が変異に対して広く対応できるのか免疫学的に興味深いデータが得られた。またナイーブT細胞から機能を有するHIV-1特異的CTLの誘導法の確立について研究を行ってきたが，長期治療HIV感染者で再活性化させた潜伏ウイルスを排除できるエフェクターを誘導可能にする治療法に寄与できることが期待されるところである。今後も，HIV-1感染症の治療法やエイズワクチンの開発の基盤となる研究活動を継続していきたい。

謝辞

令和2年度日本エイズ学会ECC山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり，長年ご指導とご鞭撻を賜わり，また本賞にご推薦いただいた熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター・滝口雅文教授に深く御礼申し上げます。また，本研究の遂行にあたり，実験や解析に協力していただいた熊本大学エイズ学研究センター滝口プロジェクト研究室の多くのスタッフに深く感謝いたします。またHIV-1感染者の検体および臨床情報の提供にご協力いただきました国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターの岡慎一先生，潟永博之先生に心より御礼申し上げます。また結晶構造解析でご協力いただきましたCardiff University（U.K）のAndrew K. Sewell教授，Dr. David K. Cole, 本園千尋先生，ナイーブT細胞からのCTLの誘導に多くのアドバスをしてくださったINSERMのDr. Victor Appayに深い感謝と御礼を申し上げます。

利益相反：本研究における利益相反に相当する事項はない。

文　献

1）O'Brien SJ, Nelson GW : Human genes that limit AIDS. Nat Genet 36 : 565–574, 2004.

2）Frahm N, Adams S, Kiepiela P, Linde CH, Hewitt HS, Lichterfeld M, Sango K, Brown NV, Pae E, Wurcel AG, Altfeld M, Feeney ME, Allen TM, Roach T, St John MA, Daar ES, Rosenberg E, Korber B, Marincola F, Walker BD, Goulder PJ, Brander C : HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. J Virol 79 : 10218–10225, 2005.

3）Honeyborne I, Prendergast A, Pereyra F, Leslie A, Crawford H, Payne R, Reddy S, Bishop K, Moodley E, Nair K, van der Stok M, McCarthy N, Rousseau CM, Addo M, Mullins JI, Brander C, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJ : Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. J Virol 81 : 3667–3672, 2007.

4）Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, Le Gall S, Rinaldo CR, Craggs SL, Allgaier RL, Power KA, Kuntzen T, Tung CS, LaBute MX, Mueller SM, Harrer T, McMichael AJ, Goulder PJ, Aiken C, Brander C, Kelleher AD, Allen TM : Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. J Virol 81 : 12382–12393, 2007.

5）Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Sáez-Cirión A, Appay V : Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. Blood 113 : 6351–6360, 2009.

6）Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferott K, Leslie A, Chetty S, Thobakgale C, Honeyborne I, Crawford H, Matthews P, Pillay T, Rousseau C, Mullins JI, Brander C,

Walker BD, Stuart DI, Kiepiela P, Goulder P : Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. J Virol 80 : 3617–3623, 2006.

7) Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M : Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. J Virol 84 : 7151–7160, 2010.

8) Tomiyama H, Fujiwara M, Oka S, Takiguchi M : Cutting edge : epitope-dependent effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CTLs to suppress HIV-1 replication. J Immunol 174 : 36–40, 2005.

9) Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM : Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. Nat Med 3 : 205–211, 1997.

10) Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S : Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. Nat Med 3 : 212–217, 1997.

11) Kawashima Y, Pfafferott K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P : Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. Nature 458 : 641–645, 2009.

12) Kuse N, Akahoshi T, Gatanaga H, Ueno T, Oka S, Takiguchi M : Selection of TI8-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. J Immunol 193 : 4814–4822, 2014.

13) Motozono C, Kuse N, Sun X, Rizkallah PJ, Fuller A, Oka S, Cole DK, Sewell AK, Takiguchi M : Molecular basis of a dominant T cell response to an HIV reverse transcriptase 8-mer epitope presented by the protective allele HLA-B*51:01. J Immunol 192 : 3428–3434, 2014.

14) Cole DK, Pumphrey NJ, Boulter JM, Sami M, Bell JI, Gostick E, Price DA, Gao GF, Sewell AK, Jakobsen BK : Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. J Immunol 178 : 5727–5734, 2007.

15) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF : Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science 278 : 1295–1300, 1997.

16) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF : Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nat Med 5 : 512–517, 1999.

17) Deeks SG : HIV : shock and kill. Nature 487 : 439–440, 2012.

18) Kuse N, Sun X, Akahoshi T, Lissina A, Yamamoto T, Appay V, Takiguchi M : Priming of HIV-1-specific CD8. EBioMedicine 42 : 109–119, 2019.

19) Gutjahr A, Papagno L, Nicoli F, Kanuma T, Kuse N, Cabral-Piccin MP, Rochereau N, Gostick E, Lioux T, Perouzel E, Price DA, Takiguchi M, Verrier B, Yamamoto T, Paul S, Appay V : The STING ligand cGAMP potentiates the efficacy of vaccine-induced CD8+ T cells. JCI Insight 4 : e125107, 2019.

20) Murakoshi H, Akahoshi T, Koyanagi M, Chikata T, Naruto T, Maruyama R, Tamura Y, Ishizuka N, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M : Clinical control of HIV-1 by cytotoxic T Cells specific for multiple conserved epitopes. J Virol 89 : 5330–5339, 2015.

21) Zou C, Murakoshi H, Kuse N, Akahoshi T, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Hanke T, Takiguchi M : Effective suppression of HIV-1 replication by cytotoxic T lymphocytes specific for pol epitopes in conserved mosaic vaccine immunogens. J Virol 93 : e0214218, 2019.

22) Murakoshi H, Zou C, Kuse N, Akahoshi T, Chikata T, Gatanaga H, Oka S, Hanke T, Takiguchi M : CD8 + T cells specific for conserved, cross-reactive Gag epitopes with strong ability to suppress HIV-1 replication. Retrovirology 15 : 46, 2018.

23) Chikata T, Murakoshi H, Koyanagi M, Honda K, Gatanaga H, Oka S, Takiguchi M : Control of HIV-1 by an HLA-B*52:01-C*12:02 protective haplotype. J Infect Dis 216 : 1415–1424, 2017.